

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 04/01178

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 03 AUG 2004	
WIPO	PCT

### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

BEST AVAILABLE COPY

**Aktenzeichen:** 103 26 187.7

**Anmeldetag:** 06. Juni 2003

**Anmelder/Inhaber:** MedInnova Gesellschaft für medizinische Innovationen aus akademischer Forschung mbH, 35037 Marburg/DE

**Bezeichnung:** Zellen als Träger für Bakterien

**IPC:** C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. Juli 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident  
Im Auftrag

Schäfer

## Albrecht, Lüke &amp; Jungblut

Patentanwälte

Gelfertstr 56, 14195 Berlin



## DE-Patentanmeldung

Dipl.-Ing. Hans Albrecht  
Patentanwalt (1933 - 1979)Dipl.-Ing. Dierck-Wilm Lüke  
Patentanwalt / European Patent Attorney /  
European Trademark AttorneyDipl.-Chem. Dr. Bernhard Jungblut  
Patentanwalt / European Patent Attorney /  
European Trademark Attorney

Anwaltsakte: MED/DE0307

Datum: 05.06.03/\*

Anmelder: MedInnova Gesellschaft für Innovationen aus akademischer  
Forschung mbH  
Biegenstrasse 4  
D-35037 Marburg

Titel: Zellen als Träger für Bakterien

Erfinder: 1) Dr. Joachim FENSTERLE, Hans-Sachs-Strasse 112, D-97204  
Hoechberg,  
2) Prof. Dr. Werner GOEBEL, Am Happach 12, D-97218  
Gerbrunn,  
3) Prof. Dr. Ulf R. RAPP, Rotweg 39, D-97082 Wuerzburg,  
4) Jochen STRIZKER, Nopitschstrasse 8, D-97074 Wuerzburg,  
5) Andreas SCHMIDT, Fanny Koenig Strasse 4, D-97299 Zell am  
Main,  
6) Priv.-Doz. Dr. Ivaylo GENTSCHEV, Bauweg 5, D-97270 Kist

Priorität: ---

## Zellen als Träger für Bakterien

### Gebiet der Erfindung

5

Die Erfindung betrifft mit Bakterien infizierte Zellen sowie deren Verwendung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, insbesondere zur Behandlung von Krebs.

10

### Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik.

Zu den neuen Ansätzen einer Therapie von bislang unheilbaren oder unzulänglich heilbaren Erkrankungen gehören die verschiedenen Möglichkeiten der Gentherapie und der Immuntherapie.

Bei der Gentherapie soll eine Nukleinsäuresequenz, welche für ein gewünschtes Protein kodiert, durch geeignete Träger in das Zielgewebe transportiert werden, dort in Zellen eindringen und diese transduzieren zur Expression des gewünschten Proteins. Zahlreiche unterschiedliche technologische Ansätze zur Gentherapie wurden entwickelt und geprüft. Insgesamt gesehen sind jedoch die klinischen Ergebnisse dieser Prüfung der unterschiedlichen Ansätze insgesamt wie auch im Besonderen bei Tumorerkrankungen eher enttäuschend. Dies hat zum wesentlichen Teil technische Probleme als Ursache. So weisen die Träger für Nukleinsäuresequenzen eine zu geringe Zielzellspezifität auf, die Anzahl von Zellen, welche transduziert werden können, ist zu gering und die Stärke und die Dauer der Expression

des gewünschten Proteins ist für einen therapeutischen Effekt zu niedrig.

Eine etablierte Form der Immuntherapie ist die Immunisierung mit einem Antigen, die sogenannte Vakzinierung. Nach einer Immunisierung mit einem Antigen entstehen im Körper spezifische Antikörper und/oder spezifische zytotoxische Lymphozyten, welche prophylaktisch oder therapeutisch wirksam sind, beispielsweise gegen Infektionserreger. Seit einigen Jahrzehnten wird mit unterschiedlichen Ansätzen versucht, auch bislang unzulänglich behandelbare oder unheilbare Erkrankungen durch eine Vakzinierung zu behandeln. Im Vordergrund steht hierbei die Therapie von Tumorerkrankungen durch eine Tumorstimmung. Ziel ist, durch eine Tumorstimmung eine Immunantwort gegen den Tumor zu bewirken, welche zur Lyse von Tumorzellen und letztlich zur Elimination des gesamten Tumorgewebes führt. Mit den bislang geprüften unterschiedlichen Tumorstimmungen konnte bislang jedoch noch kein Durchbruch in der Tumorthherapie erzielt werden. Ein wesentlicher Grund liegt in der sogenannten Immuntoleranz des Tumorträgers für seinen Tumor. So gelingt es mit einer Vielzahl von immuntherapeutischen Ansätzen zwar relativ gut, eine tumorspezifische T-Zellantwort zu induzieren, diese korreliert jedoch oft nicht mit der tumoriziden Wirkung (z. B. Thurner et al., J Exp Med 190:1669-1678 (1999)). Neuere Erkenntnisse deuten auf unterschiedliche Ursachen hin. Zu diesen gehören die zu geringe Penetration des Tumorgewebes durch spezifische T-Zellen (Mukai et al., Cancer Research 59:5245-5249 (1999)) und/oder eine Inaktivierung von T-Zellen innerhalb des Tumors (beispielsweise durch TGF- $\beta$  oder durch Expression von negativ regulatorischen Markern wie B7-H1 im Tumorgewebe oder durch Stimulation von immunsuppressiv

wirkenden regulatorischen T-Zellen (Übersicht: Bach, Nature Reviews, 3:189-198 (2003)).

In unterschiedlichen klinischen Phasen kommen derzeit mehrere Verfahren zur Tumorstimmung zum Einsatz, die häufig auf Dendritischen Zellen basieren (zusammengefasst in Bancher et al., Cell, 106:271-4 (2001)). Die häufigste Art der Immunisierung mit Dendritischen Zellen umfasst die Aktivierung der Zellen ex vivo, deren Beladung („Pulsen“) mit Antigen (beispielsweise gereinigtem Protein, Tumorzell-extrakt oder definierten Peptiden) und deren anschließenden Applikation. Alternativ werden auch Methoden verwendet, die eine Fusionierung von Zellen beinhalten. In diesem Fall werden beispielsweise bestrahlte Tumorzellen mit dendritischen Zellen durch geeignete Verfahren wie ein elektrisches Feld fusioniert und anschließend appliziert (Kugler et al., Nat Med 6:332-6 (2000)).

Mit Hilfe von rekombinanten attenuierten Bakterien wie beispielsweise Salmonellen und Listerien als Träger für ausgewählte Tumorantigene wurde eine neue Methode entwickelt, diese Immuntoleranz des Patienten für seinen Tumor zu durchbrechen (DE 102 08 653; DE 102 06 325, noch nicht offengelegt). Der Mechanismus, über welchen diese Immuntoleranz durchbrochen werden kann, ist in allen Einzelheiten bislang noch nicht verstanden. Jedoch scheinen hierbei eine wesentliche Rolle zu spielen die nach Injektion erfolgende Anreicherung von Bakterien wie beispielsweise von Salmonellen oder Listerien im Tumorgewebe und die dort durch diese Bakterien verursachte Entzündung. So ist bekannt, dass nach einer i.v. Gabe von Salmonellen es zu einer Anreicherung dieser Bakterien im Tumorgewebe

kommen kann. Kinetische Studien zeigten jedoch, dass in frühen Zeitpunkten nach einer i.v. Injektion von Bakterien nur wenige Bakterien im Tumorgewebe auffindbar sind und diese sich bevorzugt im Tumorgewebe herdförmig vermehren können. Werden somit nach i.v. Injektion größere Mengen an Bakterien im Tumor beobachtet, so leiten sich diese aus relativ wenigen Vorläufern ab (Mei et al., Anticancer Res 22:3261-6 (2002)). Für eine therapeutische Anwendung beispielsweise im Sinne einer Gentherapie mit Salmonellen als Genträger ist dieses jedoch ungünstig, da in diesem Fall keine gleichmäßige Besiedelung des Tumors erfolgt, sondern nur wenige Herde mit hoher Bakterienzahl entstehen.

15 Tumoren enthalten neben den eigentlichen Tumorzellen und dem Bindegewebe eine beträchtliche Anzahl von Leukozyten, im Besonderen von Lymphozyten (Tumor-infiltrierenden Lymphozyten; TIL) und von Makrophagen (Tumor-assoziierten Makrophagen; TAM). Es wird angenommen, dass die Tumorlokalisation von Leukozyten durch Expressionsprodukte der Tumorzellen, im besonderen durch Cytokine, Endotheline sowie auch durch die Hypoxie beeinflusst wird (Sica et al., Int Immunopharmacol, 2: 1045-1054 (2002); Grimshaw et al., Eur J Immunol, 32:2393-2400 (2002)).

25 Die Funktion der im Tumor lokalisierten Leukozyten ist widersprüchlich. Besonders für TAM wurde eine antitumorale (Antigenpräsentation; Zytotoxizität; Funada et al., Oncol Rep, 10:309-313 (2003); Nakayama et al., AntiCancer Res 22:4291-4296; Katakaki et al., J Lab Clin Med, 140:320-328 (2002)). Wie auch eine das Tumorstadium fördernde Aktivität (Sekretion von Wachstumsfaktoren; Förderung der Angiogenese und der Metastasierung; Leek und Harris J.,

Mammary Gland Biol Neoplasia, 7:177-189 (2002); ver-  
minderte Sekretion von zytotoxischen Zytokinen wie Il-1  
alpha; Il-1beta; Il-6; TNF alpha; Kataki et al., J Lab  
Clin Med, 140:320-328 (2002)) nachgewiesen.

- 5
- Seit längerem wurde versucht, durch die Verabreichung von  
zytotoxischen Lymphozyten, TIL, Natürlichen Killerzellen,  
Makrophagen oder Dendritischen Zellen das Tumorwachstum zu  
beeinflussen. Die klinischen Ergebnisse waren jedoch wid-  
10 ersprüchlich (Faradji et al., Cancer Immunol Immunotherap,  
33:319-326 (1991); Montovani et al., Immunology Today,  
13:265-270 (1992); Ravaud et al., British J of Cancer, 71:  
331-336 (1995); Gemino et al., Minerva Biotec, 11:311-317,  
(1999)). Experimentell konnte gezeigt werden, dass die  
15 Injektion von gering aktivierten Makrophagen zu einer  
Förderung, von stark aktivierten Makrophagen zu einer Hem-  
mung des Tumorwachstums führen kann (Mantovani et al.,  
Immunology Today 13:265-270 (1992)). Dabei scheint die  
Applikation aktivierter Makrophagen die Tumorlokalisation  
20 zu begünstigen (Fidler, Adv Pharmacol, 30:271-326 (1974);  
Chokri et al., Int J Immunol, 1:79-84, (1990)). Auch die  
Injektion von Leukozyten, welche in vitro mit einer Gense-  
quenz kodierend für ein antitumorales Protein transduziert  
worden waren, erbrachten klinisch bislang keinen  
25 Durchbruch in der Behandlung von Tumoren (Hege and Rob-  
erts, Current Opinion in Biotechnology, 7:629-634 (1996)).  
Im Rahmen dieser Versuche wurde jedoch gezeigt, dass  
Leukozyten aber auch andere Zellen, insbesondere Tumorzell-  
len, nach i.v. Injektion das Tumorgewebe erreichen können  
30 (Shao J et al., Drug Deliv 2 (2001)) dass jedoch der  
weitaus größte Teil der applizierten Zellen in Normalgewe-  
ben wie Lunge, Milz und Leber ansiedeln (Adams J, Clin  
Pathol Mol Path 49:256-267 (1996)).

Technisches Problem der Erfindung.

- A
- 5 Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, Mittel zu schaffen, mittels welcher die Zielzelllokalisation, insbesondere Tumorlokalisation, von Mikroorganismen, welche für Wirkstoffe codierende fremde DNA enthalten, verbessern läßt.

10

Erkenntnisse und Grundzüge der Erfindung sowie Ausführungsformen.

- 15 Der Erfindung liegt die Erkenntnis zu Grunde, dass Makrophagen oder dendritische Zellen, welche in vitro mit Bakterien infiziert, d.h. beladen wurden, diese nach intravenöser Verabreichung in das Tumorgewebe transportieren, dass die Menge der in dem Tumor lokalisierten Bak-
- 20 terien nach i.v. Injektion von in vitro mit Bakterien beladenen Makrophagen deutlich höher war als nach i.v. Injektion einer entsprechenden Menge freier Bakterien, dass selbst infizierte heterologe Tumorzellen sich in Tumoren anreichern, und dass dieser Effekt auch dann beste-
- 25 hen bleibt, wenn die infizierten Zellen zuvor durch Bestrahlung inaktiviert wurden.

Wurden Makrophagen beispielsweise als Träger für Salmonellen verwendet, so ließen sich in zwei unterschiedlichen

30 transgenen Tumormodellen (Lungentumormodell: Raf-transgene Mäus, Kerkhoff et al., Cell Growth Differ, 11:185-90 (2000), Brusttumormodell: Her-2 transgene Mäuse, Bouchard et al., Cell, 57:931-6 (1989)) 18 Stunden nach i.v.



Applikation der mit Salmonellen beladenen Makrophagen zehn mal mehr Salmonellen im Tumorgewebe nachweisen als nach i.v. Injektion einer entsprechenden Menge freier Salmonellen.

5

Ähnliches zeigte sich bei der Verwendung einer heterologen Tumorzelllinie. Die Tumorzelllinie 4T1 (ATCC Nr. CRL-2539) leitet sich aus einem Tumor des Brustdrüsengewebes von BALB/c Mäusen ab und wurde nach Infektion mit attenuierten

10 Listerien in dem beschriebenen Raf-Tumormodell (C57BL/6 Hintergrund) appliziert. Auch hier zeigte sich bei der Verwendung infizierter Zellen eine stark erhöhte Zahl von Bakterien im Tumorgewebe, die auch bei vorheriger Bestrahlung der Zellen bestehen blieb.

15

Grundsätzlich lassen sich diese überraschenden Beobachtungen somit auf beliebige Zellen ausweiten, soweit sich diese Zellen durch Bakterien infizieren lassen oder an diese Bakterien fest anhaften und damit Träger für diese

20 Bakterien sind. So zeigte sich beispielsweise in den o.a. Tumormodellen, dass die Lokalisation von Salmonellen im Tumorgewebe weitaus größer war nach i. v. Injektion von Tumorzellen, die infiziert waren mit Salmonellen als nach i. v. Injektion einer entsprechenden Menge freier

25 Salmonellen.

Bakterien besitzen insbesondere durch bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS), Zellwandbestandteile, Flagellen, bakterielle DNA mit immunstimulatorischen CpG

30 Motiven, die allesamt mit unterschiedlichen sogenannten Toll-Like Rezeptoren (TLR) auf Antigen-präsentierenden Zellen interagieren und diese somit stimulieren können, einen starken adjuvanten Effekt. Es ist daher zu erwarten,

119

dass eine Infektion von Zellen mit Bakterien und die Ver-  
breichung dieser Zellen nicht nur eine verbesserte An-  
reicherung der Bakterien am Tumor bewirkt, sondern dass  
diese Infektion auch eine Entzündung und eine Verstärkung  
5 der systemischen sowie lokalen Immunantwort zur Folge ha-  
ben wird. Dadurch lässt sich diese Methode auch für eine  
Steigerung der lokalen Immunantwort im Rahmen einer Immun-  
therapie einsetzen.

- 10 Gegenstand der Erfindung sind somit Zellen eines Säugers,  
welche beladen sind mit Bakterien und die Verwendung die-  
ser Zellen zur Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung.

Zellen im Sinne dieser Erfindung können beispielsweise  
15 sein autologe, allogene oder xenogene Makrophagen, Lym-  
phozyten, Dendritische Zellen oder Tumorzellen. Bei der  
Verwendung von Tumorzellen werden diese vorzugsweise der-  
art bestrahlt oder mit einem Zytostatikum behandelt, dass  
ihre Teilungsfähigkeit blockiert ist. Derartige Zellen  
20 werden vorzugsweise aus dem Blut oder aus Tumoren mit dem  
Fachmann bekannten Methoden isoliert. Zur Verwendung kön-  
nen jedoch auch kommen in der Kultur etablierte autologe,  
allogene oder xenogene Zellen, sogenannte Zell-Linien aus  
Normalgeweben oder aus Tumoren. Derartige Zell-Linien sind  
25 beispielsweise von Zellbanken wie der amerikanischen Gewe-  
bezelbank (ATCC) in beliebiger Zahl und Art erhältlich.  
Desweiteren können auch Zellen zur Verwendung kommen, die  
durch dem Fachmann bekannte Verfahren modifiziert wurden.  
Modifikationen umfassen hier insbesondere genetische Modi-  
30 fikationen aber auch zusätzliche Beladung der Zellen wie  
z. B. mit Peptiden, Proteinen, pharmakologischen Wirkstof-  
fen oder viralen Partikeln.

Beladung im Sinne der Erfindung ist die Adsorption von Bakterien an die Zelle, die Phagozytose der Bakterien durch die Zelle und/oder die Infektion der Zelle.

- 5 Bakterien im Sinne der Erfindung sind beispielsweise gram-negative und grampositive Bakterien, vorzugsweise fakultativ intrazelluläre Bakterien, vorzugsweise Salmonellen oder Listerien, vorzugsweise solche Bakterien, welche teilungsfähig sind, jedoch keine Pathogenität für den Empfänger aufweisen oder in ihrer Virulenz attenuiert sind oder abgetötet sind. In der Virulenz attenuierte Bakterien sind beispielsweise dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Chromosom dieser Bakterien mindestens ein Gen für ein Stoffwechselenzym deletiert oder so mutiert ist, dass das Stoffwechselenzym defekt ist. In diesen Bakterien kann i) ein Gen für ein Enzym zur Synthese von aromatischen Aminosäuren im Chromosom deletiert sein, beispielsweise das *aroA* Gen, welches für das erste Enzym in der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren kodiert, so dass diese Bakterien in ihrem Wachstum abhängig sind von der Anwesenheit aromatischer Aminosäuren ii) diejenigen Proteine, welche die Motilität der Bakterien ermöglichen, unbeeinträchtigt exprimiert werden, beispielsweise die Funktionsfähigkeit der Gene *iap* und *actA* erhalten ist, und iii) das Gen *trpS* kodierend für tryptophanyl-tRNA-synthetase im Chromosom deletiert sein, wobei in diese Bakterien Plasmide eingeführt worden sind, iv) deren Replikation stabilisiert wurde durch einen geeigneten "Replication origin", beispielsweise durch *ori pAM $\beta$ 1* (Simon and Chopin, 1988), v) die das *trpS* Gen kodierend für tryptophanyl-tRNA-synthetase enthalten, vi) die ein Gen für ein Endolysin, beispielsweise das Lysis Gen des Phagen  $\lambda$ 18 (*ply 118*; Loessner et al., 1995) unter der Kontrolle

eines im Cytosol von Säugerzellen aktivierbaren Promoters, beispielsweise des actA Promoters (PactA, Dietrich et al., 1998) enthalten, und vii) die mindestens eine Nukleotidsequenz kodierend für mindestens einen Wirkstoff unter der Kontrolle eines in Bakterien oder in Säugerzellen aktivierbaren Promoters, enthalten, wobei die Aktivierung des Promoters zellunspezifisch, zellspezifisch, zellzyklusspezifisch, zellfunktionsspezifisch oder abhängig von Metaboliten, Arzneimitteln oder von der Sauerstoffkonzentration erfolgen kann.

Derartige Bakterien weisen durch den Verlust mindestens eines Gens für ein essentielles Stoffwechselprotein eine drastische Verminderung ihrer Virulenz beispielsweise gemessen an ihrer in vivo Vermehrungsfähigkeit auf und zeigen trotzdem eine erheblich gesteigerte Bactofection, eine Lyse der Bakterien im Cytosol, eine Freisetzung der in den Bakterien enthaltenen Plasmide und eine stabile Expression des vom Plasmid kodierten Wirkstoffes. Ein solcher bakterieller Mikroorganismus enthält in aller Allgemeinheit eine fremde Nukleinsäuresequenz, welche für einen Wirkstoff codiert und optional unter der Kontrolle einer regulatorischen Nukleinsäuresequenz steht, wobei in der chromosomalen DNA des Mikroorganismus eine natürliche und für die Expression eines bakteriellen Enzyms codierende Nukleinsäuresequenz des Bakteriums entweder deletiert oder mit der Maßgabe mutiert ist, dass ein hieraus entstehendes Translationsprodukt nicht-funktionell ist, und wobei der Mikroorganismus keine fremde Nukleinsäuresequenz enthält, welche für das Enzym codiert.

Beispiele für intrazelluläre Bakterien sind: Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. bovis strain BCG, BCG

substrains, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. avium* subspecies *paratuberculosis*, *Nocardia asteroides*, andere *Nocardia* species, *Legionella pneumophila*, andere *Legionella* species  
5 *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, andere *Salmonella* species, *Shigella* species, *Yersinia pestis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, andere *Pasteurella* species, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *Brucella abortus*, andere *Brucella*  
10 species, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii*.

Beispiele für Attenuierungen von Salmonellen sind:

Inaktivierende Mutationen in einem *pab* Gen, einem *pur* Gen,  
15 einem *aro* Gen, *asd*, einem *dap* Gen, in *nadA*, *pncB*, *galE*, *pmi*, *fur*, *rpsL*, *ompR*, *htrA*, *hemA*, *cdt*, *cya*, *crp*, *dam*, *phoP*, *phoQ*, *rfe*, *poxA*, *galU*, *metL*, *metH*, *mviA*, *sodC*, *recA*, *ssrA*, *ssrB*, *sirA*, *sirB*, *sirC*, *inv*, *hlyA*, *hlyC*, *hlyD*, *rpoE*, *flgM*, *tonB* oder *slyA*, und Kombinationen davon. Die inak-  
20 tivierenden Mutationen der beispielhaft aufgeführten Gene zur Attenuierung von Salmonellen sind dem Fachmann geläufig.

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren Zellen, welche  
25 Träger von Bakterien sind, wobei in diese Bakterien Nukleinsäuresequenzen eingeführt worden sind, welche für ein Protein kodieren, wobei diese Proteine vorzugsweise Wirkstoffe zur Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung darstellen.

30

Derartige Proteine können beispielsweise sein: Antigene von Infektionserregern wie Viren, Bakterien, Mycoplasmen, Parasiten, Antigene spezifisch für Tumore, im Besonderen

Proteine kodiert von Oncogenen, Antikörper, Epitop-  
bindende Fragmente von Antikörpern und Fusionsproteine  
enthaltend mindestens ein Epitop- bindendes Fragment eines  
Antikörpers, gerichtet beispielsweise gegen ein Antigen  
5 auf einer Tumorzelle, einem Lymphozyten wie beispielsweise  
einem T-Lymphozyten oder einer Endothelzelle wie beispiel-  
sweise einer Tumorendothelzelle, Enzyme, im besonderen  
Enzyme zur Aktivierung von inaktiven Vorstufen eines Ar-  
zneimittels wie beispielsweise eine  $\beta$ -Glucuronidase, eine  
10 Phosphatase, eine Hydrolase, eine Lipase, Immunsuppressive  
Cytokine wie beispielsweise IL-10, Immunstimulierende Cy-  
tokine wie beispielsweise IL-1, IL-2, IL-3 oder IL-6,  
Chemokine, Interferone, Wachstumsfaktoren wie beispiel-  
sweise G-CSF, GM-CSF, M-CSF, FGF, VEGF oder EGF, oder  
15 Inhibitorische Proteine für Cytokine, Chemokine, Interfer-  
one oder Wachstumsfaktoren.

Die Regulation der Expression dieser Gene in den Bakterien  
erfolgt durch geeignete Promotoren, wobei diese von den  
20 Bakterien oder von Viren oder von Eukaryonten stammen und  
unspezifisch, zellspezifisch oder funktionsspezifisch ak-  
tivierbar sein können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Er-  
25 findung werden dem Gen Nukleinsäuresequenzen angefügt,  
welche die transmembrane Expression oder die Sekretion des  
von dem Gen kodierten Proteines durch das Bakterium er-  
möglichen. Beispiele für derartige sogenannte Signalse-  
quenzen sind in den Literaturstellen EP 1042495, EP  
30 1015023 und Hess et al., PNAS USA 93:1458-1463 (1996)  
beschrieben.

Gegenstand der Erfindung ist des Weiteren die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zelle für die Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Zellen verwendet, um eine Tumorerkrankung 5 oder eine Immunerkrankung zu behandeln. Hierzu kodiert das in die Bakterien eingefügte Gen ein Protein, welches i) tumorzytolytisch ist, ii) proinflammatorisch wirkt, iii) negativ regulierende Immunzellen inhibiert wie beispielsweise durch Inhibition von CTLA-4, von B7-H1 oder von 10 CD25 oder von TGF $\beta$ , iv) immunsuppressiv wirkt oder v) eine inaktive Vorstufe einer zytotoxischen, immunmodulierenden oder immunsuppressiven Substanz in einen aktiven Wirkstoff verwandeln kann.

15 Zur Vorbeuge oder Behandlung einer Erkrankung werden vorzugsweise 100 bis 10<sup>9</sup> Zellen verabreicht, welche vorzugsweise pro Zelle etwa 0,1 (im statistischen Mittel) bis 100 Bakterien tragen. Derartige Zellen werden lokal auf die Haut, in den Kreislauf, in eine Körperhöhle, in ein 20 Gewebe, in ein Organ oder peroral, rektal oder bronchial mindestens einmal verabreicht.

Erkrankungen, bei welchen die erfindungsgemäßen Zellen verwendet werden, stellen beispielsweise Tumorerkrankun- 25 gen, Autoimmunerkrankungen, chronische Entzündungen und Organverpflanzungen dar.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

30

B  
Beispiele zur Verdeutlichung der Erfindung

Beispiel 1: Lieferung von Salmonella typhimurium 7207  
durch infizierte autologe  
Knochenmarksmakrophagen

5 1.1: Isolierung von Knochenmarksmakrophagen (MΦ).

Es wurden ca. 2-3 Monate alte BxB23, bzw. ca 2 Monate alte MMTV/neu transgene Mäuse für die Isolierung von Knochenmarksmakrophagen verwendet. Die Isolierung der Makrophagen erfolgte nach folgendem Protokoll: i) Oberschenkelknochen  
10 der Maus entfernen, ii) Knochen in Petrischale von Weichteilen befreien und an beiden Seiten aufschneiden, iii) Knochenmark mit 2 ml DMEM 10 (DMEM Gibco mit 10% FCS Gibco, 2mM L-Glutamin Gibco, 50 µM β-Merkaptoethanol Gibco) mit Hilfe einer Spritze in Bluecap mit DMEM 10  
15 spülen, iv) Zentrifugation für 5' bei 1200 rpm, absaugen und in 5 ml Differenzierungsmedium aufnehmen. Auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/ ml in Differenzierungsmedium einstellen (DMEM 10 + 10 ng/ml GM-CSF (recombinant Mouse Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor; RD Sys-  
20 tems, Wiesbaden Cat.-Nr.:415-ML) und in 5 ml Portionen in Nunc Kulturschalen (NUNCLOON™, 58mm, NUNC Nr.:16955) verteilen, v) 8 Tage bei 37°C und 10% CO2 inkubieren, vi)

25 1.2: Infektion von Makrophagen mit Salmonella typhimurium 7207 (SL7207) in vitro.

Die an der NUNC-Zellkulturschale adhärrierenden MΦ wurden mit DMEM gewaschen und anschließend wurden mit einem Zellschaber die adhären Zellen geerntet, gezählt und in  
30 Differenzierungsmedium aufgenommen. Die Infektion mit SL7207 (Hoiseth S.K. et al., Nature 291:238-239 (1981)) erfolgte nach folgendem Protokoll: i) 37°C, 1h im Brutschrank: MOI (multiplicity of infection) 1:20, ii)  $10^6$  Makrophagen wurden in 2 ml Medium in einer NUNC



7

Zellkulturschale ausgesät und mit  $2 \times 10^7$  Bakterien ( $\text{MOI} = 20$ ) 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, iii) anschließend waschen, iv) mit Gentamycin (Endkonz.  $100 \mu\text{g/ml}$  (Sigma)) 1h,  $37^\circ\text{C}$  inkubieren, v) waschen, Zellzahl bestimmen, ausplattieren auf Brain Heart Infusion (BHI)-Platten (Gibco) für die Auszählung der bakteriellen colony-forming units (CFUs)

1.3: Ergebnisse der Beladung von Makrophagen.

Bei einer  $\text{MOI}$  von 20 und einer einstündigen Beladungsdauer lassen sich konstant ca.  $10^4$  Salmonellen in  $10^5$  Makrophagen nachweisen. Die Beladungsdichte blieb für 12 Stunden nach der Beladung annähernd konstant und zeigt keinerlei Proliferation der Bakterien.

1.4: Applikation von „in vitro“ mit SL 7207 infizierten Makrophagen in BxB23 und MMTV/neu Tumormäusen.

Es wurden  $5 \cdot 10^5$  in vitro infizierte Knochenmarks-Makrophagen, suspendiert in  $100 \mu\text{l}$  PBS i.v. und pro Maus in die Schwanzvene von BxB23 bzw. MMTV/neu Tumormäusen injiziert (die verwendeten Versuchstiere zeigten fortgeschrittene Tumorentwicklung, Alter ca. 12 Monate, bei den BxB23 Mäusen betrug die Lungenmasse durch die Lungentumoren  $0,75 - 1,25\text{g}$ ). Je nach Experiment wurde (durch Auszählung der CFUs bestimmt) pro Maus eine Bakterienzahl von  $3 - 5 \cdot 10^4$  S. typhimurium 7207 injiziert. Als Kontrolle wurden BxB23 und MMTV/neu Tumormäusen S. typhimurium 7207 i.v. ( $2,5 \cdot 10^5$  Bakterien suspendiert in  $100 \mu\text{l}$  PBS pro Maus) appliziert. Nach 18 Std. wurden die Tiere getötet und die CFU (ausplattiert auf BHI-Platten) in der Lunge (BxB23) bzw. dem Tumor (MMTV) bestimmt. Verlaufsuntersuchungen der Infektion erfolgten in der Kontrollgruppe nach i.v. Injektion von S. typhimurium aroA 7207. Hierzu wurden mit dem gleichen Protokoll zu

24

unterschiedlichen Zeitpunkten die Bakterienzahl durch Bestimmung der CFUs untersucht.

1.5: Anreicherung von *S. typhimurium* 7207 in Tumoren nach  
5 i.v. Injektion: In den tumortragenden Lungen von BxB23  
Mäusen, als auch in Mammatumoren von MMTV/neu Mäusen wurde  
nach Verabreichung von mit Salmonellen infizierten Makro-  
phagen im Vergleich mit Tieren in der Kontrollgruppe, die  
mit freien Salmonellen behandelt worden waren, 18 Stunden  
10 nach der Infektion mehr als die zehnfache Menge an Salmo-  
nellen nachgewiesen. Nach Injektion von Bakterien beladenen  
Makrophagen war die Anreicherung der Bakterien schon  
18 Stunden nach der Injektion so hoch (Faktor 10 höher wie  
bei der Injektion nackter Bakterien, siehe Fig. 1 und  
15 zugehörige Tabelle), wie sie vergleichsweise in der Kon-  
trollgruppe (d. h. nach Injektion der Bakterien alleine)  
erst nach einigen Tagen (Tag 5 nach Infektion) erreicht  
werden konnte. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Bakterien-  
beladenen Zellen konnten demnach eine deutlich größere  
20 Anzahl von Bakterien in einer wesentlich kürzeren Zeit in  
den Tumor angereichert werden als es nach Injektion der  
reinen Bakteriensuspension möglich war. Wurden an den  
Tagen 1, 7, 14 nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen  
die CFUs in den Lungen und den Organen bestimmt, so ergab  
25 sich, dass in den Lungen der tumortragenden BxB23 Mäusen  
die CFUs konstant hoch blieben oder zunahmen, während in  
den Lungen der C57BL/6 Kontroll-Mäuse wie auch in den Mil-  
zen der BXB23 Mäuse und der C57BL/6 Mäuse die CFUs deut-  
lich unter die Werte in den jeweiligen Lungen sanken oder  
30 nicht mehr nachweisbar waren (siehe Fig. 2 und Fig. 3,  
sowie zugehörige Tabellen; Fig. 2 zeigt einen Vergleich  
der CFUs in Lungen von (Lungen-) tumortragende BxB23 Mäuse  
mit Lungen der Kontrolltiere C57BL/6, Fig. 3 einen

Vergleich der CFUs in den Mammatumoren und in der Milz von MMTV/neu Mäusen nach i.v. Injektion von  $5 \times 10^5$  *S.typhimurium*).

5

Beispiel 2: Lieferung von *L. monocytogenes* durch infizierte heterologe Zellen

- 4T1 Zellen (ATCC CRL-2539) einer Tumورlinie aus einem  
10 Brustdrüsentumor von BALB/c Mäusen wurden mit dem attenuierten *L. monocytogenes* Stamm und einer MOI von 10 über einen Zeitraum von 1 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und freie Bakterien durch eine Stunde Inkubation in Anwesenheit von Gentamycin abgetötet. Die  
15 Bestimmung der CFUs ergab eine Beladung der Zellen mit 0,15 Bakterien pro Zelle. Die Zellzahl wurde auf  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml in PBS eingestellt. Zusätzlich wurde ein Teil der infizierten Zellen durch Bestrahlung inaktiviert. In tumortragende BxB23 Mäuse (Alter > 10 Monate) oder  
20 C57BL/6 Mäuse gleichen Alters wurden pro Maus 0,1 ml dieser Suspension [d.h.  $5 \times 10^5$  infizierte Zellen (gemessene CFU Listerien:  $7,3 \times 10^4$ ),  $3,5 \times 10^5$  infizierte und bestrahlte Zellen oder (gezählte CFUs)  $3,5 \times 10^5$  freie Listerien in jeweils 100 µl PBS] i.v. injiziert.  
25 Bei der verwendeten Strahlendosis erfolgt eine über die CFU Bestimmung nachgewiesene Reduktion freier Bakterien um maximal 25%, wodurch sich im Falle bestrahlter Zellen rechnerisch eine Infektionsdosis von ca.  $3,8 \times 10^4$  Bakterien ergab.  
30  
17 h nach der Infektion wurde die bakteriellen CFUs in der Lunge und Milz durch seriellies Plattieren auf BHI Platten (Gibco) bestimmt (Detektionslimit 10 Bakterien pro Organ).

Dabei zeigten entsprechend der nachweisbaren CFUs in der Milz alle Tiere eine erfolgreiche Infektion. In den Lungen von tumortragenden BxB23 Mäusen wie auch von den C57BL/6 Kontroll-Mäusen war die Anzahl der CFUs nach Injektion der 5 erfindungsgemäßen lebenden oder bestrahlten Zellen deutlich höher als nach Injektion der Bakteriensuspension, wobei die Bakterienzahl nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen in den Lungen der tumortragenden BxB23 Mäuse im Vergleich zu den der Bakterienzahl in den Lungen 10 der C57BL/6 Kontroll-Mäusen deutlich erhöht war (Faktor 10). In der Milz waren in allen Gruppen erheblich mehr bakterielle CFUs nachweisbar als in der Lunge, jedoch konnte kein deutlicher Unterschied in der Zahl der bakteriellen CFUs nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen oder 15 der Bakteriensuspension sowohl bei tumortragenden BxB23 Mäusen wie auch bei den C57BL/6 Kontroll-Mäusen nachgewiesen werden (siehe Fig. 4 und die zugehörige Tabelle).

Wie bereits in den o.a. Kontrollgruppen zu den Versuchen 20 mit Makrophagen, beladen mit Virulenz-attenuierten *S. typhimurium* 7207, dargestellt, vermindert sich auch bei Virulenz-attenuierten *L. monocytogenes* innerhalb eines Zeitraumes von etwa 5 Tagen, maximal jedoch 14 Tagen nach Injektion sowohl der erfindungsgemäßen Zellen wie auch der 25 reinen Bakteriensuspension die Anzahl der bakteriellen CFUs in der Milz wie auch in anderen, nicht tumorbelasteten Organen sowohl bei den tumortragenden BxB23 Mäusen wie auch bei C57BL/6 Kontroll-Mäusen auf Werte, welche deutlich unterhalb der Werte der CFUs in den Lungen der 30 (Lungen-) tumortragenden BxB23 liegen.

Im Gegensatz hierzu bleibt in den Lungen der (Lungen-) tumortragenden BxB23 Mäusen die initial erhöhte Anzahl von

75

19

bakteriellen CFUs nach Injektion der erfindungsgemäßen Zellen über den gesamten Zeitraum zumindest bestehen oder nimmt sogar noch anfänglich zu, um erst nach einer längeren Plateauphase wieder abzusinken.

5

10

15

20

25

30

Tabelle 1: Bakterienzahl in Lungen oder Tumoren infizierter Mäuse 18 Stunden nach i.v. Injektion von infizierten Makrophagen oder freien Salmonellen.

Mauslinie	S.t. + Makrophagen			S. typhimurium		
	CFU	SEM	n	CFU	SEM	n
BxB 23 (Lunge)	9.000	3.600	3	0	0	2
MMTV Her (Tumor)	5.850	1.552	4	66	66	2

Tabelle 2: Vergleich der CFUs in Lungen von (Lungen-) tumortragenden BxB23 Mäuse mit Lungen der Kontrolltiere C57BL/6.

Tag	BxB23			WT C57BL/6		
	CFU	SEM	n	CFU	SEM	n
2	1.485	1.335	2			
3	1.255	229	7	700	600	2
4	910	210	2			
5	2.469	1.503	6			
7	4.499	1.694	6	500	400	2
14	2.900	1.700	2	750	250	2
18	2.225	975	2			

Tabelle 3: Vergleich der CFUs in den Mammatumoren und in der Milz von MMTV/neu Mäusen nach i.v. Injektion von  $5 \times 10^5$  S.typhimurium aroA.

Tag	Tumor			Milz		
	Log(CFU)	SEM	n	Log(CFU)	SEM	n
3	2,67	0,24	2	4,85	0,10	2
4	3,19	0,68	4			
18	3,20	0,20	2	2,14	0,08	2

17

Tabelle 4: Bakterienzahl in infizierter Mäuse 17 Stunden nach Infektion mit infizierten 4T1 Brusttumorzellen mit (irrad. Cells) oder ohne (inf. Cells) Bestrahlung mit 25 gray oder freien Listerien.

	BxB 23			C57BL/6	
	inf. Zellen	inf. bestrahlte Zellen	L. mon. aroA	inf. Zellen	L. mon. aroA
Log(CFU)	3,572	2,437	0,6344	2,601	0,4337
SEM	0,1333	0,5261	0,6344	0,01688	0,4337
n	3	3	3	3	3

Tabelle 5: Bakterienzahl in der Milz infizierter Mäuse 17 Stunden nach Infektion mit infizierten 4T1 Brusttumorzellen mit (irrad. Cells) oder ohne (inf. Cells) Bestrahlung mit 25 Gray oder freien Listerien.

	BxB 23			C57BL/6	
	inf. Zellen	inf. bestrahlte Zellen	L. mon. aroA	inf. Zellen	L. mon. aroA
Log(CFU)	5,224	2,934	4,045	4,37	4,57
SEM	0,1596	0,4338	0,9131	0,3023	0,2573
n	3	3	3	3	3

28

## Patentansprüche:

- 1.) Zelle von Säugern, welche mit Bakterien beladen ist,  
zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei  
5 die Zelle autolog, allogene oder xenogene, und aus-  
gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus  
"Makrophagen, Dendritische Zellen, Granulozyten,  
Lymphozyten, Tumorzellen und Gewebezellen".
- 10 2.) Zelle nach Anspruch 1, welche durch Bestrahlung oder  
andere Methoden inaktiviert ist.
- 3.) Zelle nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Bakterien  
15 lebend, nicht virulent, in ihrer Virulenz attenuiert  
oder tot sind.
- 4.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die  
Bakterien ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend  
20 aus "Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. bovis  
strain BCG, BCG substrains, M. avium, M. intracel-  
lulare, M. africanum, M. kansasii, M. marinum, M.  
ulcerans, M. avium subspecies paratuberculosis, No-  
cardia asteroides, andere Nocardia species, Le-  
gionella pneumophila, andere Legionella species,  
25 Salmonella typhi, S. typhimurium, andere Salmonella  
species, Shigella species, Yersinia pestis, Pas-  
teurella haemolytica, Pasteurella multocida, andere  
Pasteurella species, Actinobacillus pleuropneumo-  
niae, Listeria monocytogenes, L. ivanovii, Brucella  
30 abortus, andere Brucella species, Chlamydia pneumo-  
niae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci und  
Coxiella burnetii".



- 5.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Bakterien rekombinante DNA tragen, wobei die DNA für mindestens einen Wirkstoff kodiert.
- 6.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens ein Wirkstoff mit Hilfe geeigneter Promotoren durch die Bakterien selbst produziert wird oder dessen Expression unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promoters steht.
- 7.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Produktion intrazellulär, membranständig oder sekretiert erfolgt.
- 8.) Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei welchem der Wirkstoff ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Antigene von Infektionserregern <sup>in vivo</sup> wie Viren, Bakterien, Mycoplasmen, Parasiten, Antigene spezifisch für Tumore, im Besonderen Proteine kodiert von Oncogenen, Antikörper, Epitop-bindende Fragmente von Antikörpern und Fusionsproteine enthaltend mindestens ein Epitop- bindendes Fragment eines Antikörpers, gerichtet beispielsweise gegen ein Antigen auf einer Tumorzelle, einem Lymphozyten <sup>in vivo</sup> wie beispielsweise einem T-Lymphozyten oder einer Endothelzelle <sup>in vivo</sup> wie beispielsweise einer Tumorendothelzelle, Enzyme, im besonderen Enzyme zur Aktivierung von inaktiven Vorstufen eines Arzneimittels <sup>in vivo</sup> wie beispielsweise eine  $\beta$ -Glucuronidase, eine Phosphatase, eine Hydrolase, eine Lipase, Immunsuppressive Cytokine <sup>in vivo</sup> wie beispielsweise IL-10, Immunstimulierende Cytokine

- ~~wie beispielsweise~~ IL-1, IL-2, IL-3 oder IL-6, Chemokine, Interferone, Wachstumsfaktoren ~~wie~~ <sup>insbes.</sup> ~~beispielsweise~~ G-CSF, GM-CSF, M-CSF, FGF; VEGF oder EGF oder inhibitorische Proteine für Cytokine, Chemokine, Interferone oder Wachstumsfaktoren".
- 5
- 9.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei der Wirkstoff negativ regulatorische Elemente im Tumorgewebe blockiert.
- 10
- 10.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei die Bakterien als proinflammatorisches Stimulans in Tumorgewebe dienen.
- 15
- 11.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei Dendritische Zellen oder Makrophagen gleichzeitig als Träger für ein Impfantigen eingesetzt werden.
- 20
- 12.) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei der Wirkstoff und/oder das Impfantigen ex vivo auf die Dendritische Zellen oder auf die Makrophagen beladen wird.
- 25
- 13.) Verwendung nach Anspruch 12), wobei das Impfantigen aus definierten Peptiden besteht.
- 30

- 14.) Verwendung nach Anspruch 10), wobei die Zelle fusioniert ist mit einer anderen Zelle, welche ein Gewebeanigen oder ein Tumoranigen exprimiert.
- 5 15.) Verwendung nach Anspruch 14, wobei die fusionierten Zellen autologe Tumorzellen sind.
- 16.) Verwendung der Zellen nach einem der Ansprüche 1) bis 8 für die Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung.
- 10
- 17.) Verwendung einer Zelle, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 8, welche mit einem eine fremde DNA enthaltenden Mikroorganismus, insbesondere bakteriellen Mikroorganismus, beladen ist, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung.
- 15
- 18.) Verwendung nach Anspruch 17, wobei die fremde DNA für einen definierten Wirkstoff kodiert und wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur Prophylaxe oder Behandlung einer Erkrankung bestimmt ist, welche mit dem Wirkstoff verhinderbar und/oder behandelbar ist.
- 20

25

30

3

26

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Zelle, welche mit einem eine fremde DNA enthaltenden Mikroorganismus, insbesondere bakteriellen Mikroorganismus, beladen ist, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, wobei vorzugsweise die fremde DNA für einen definierten Wirkstoff kodiert und wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur Prophylaxe oder Behandlung einer Erkrankung bestimmt ist, welche mit dem Wirkstoff behandelbar ist.

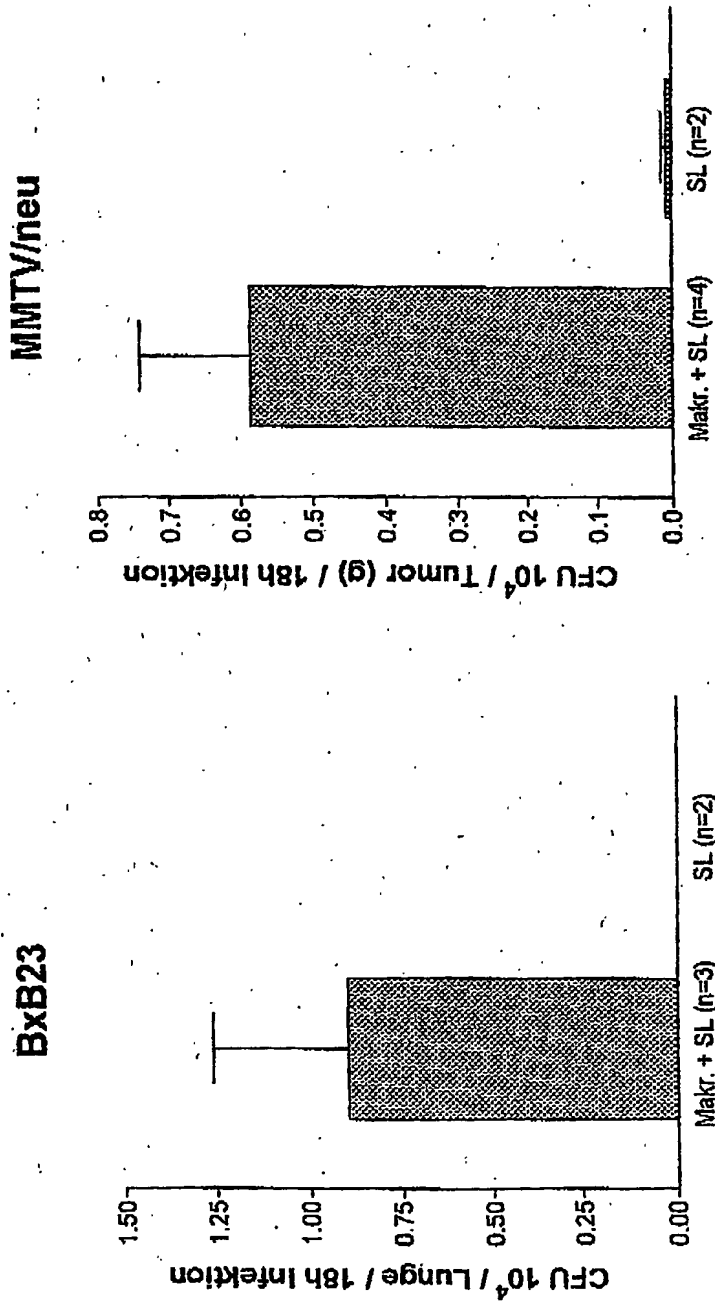
15

20

25

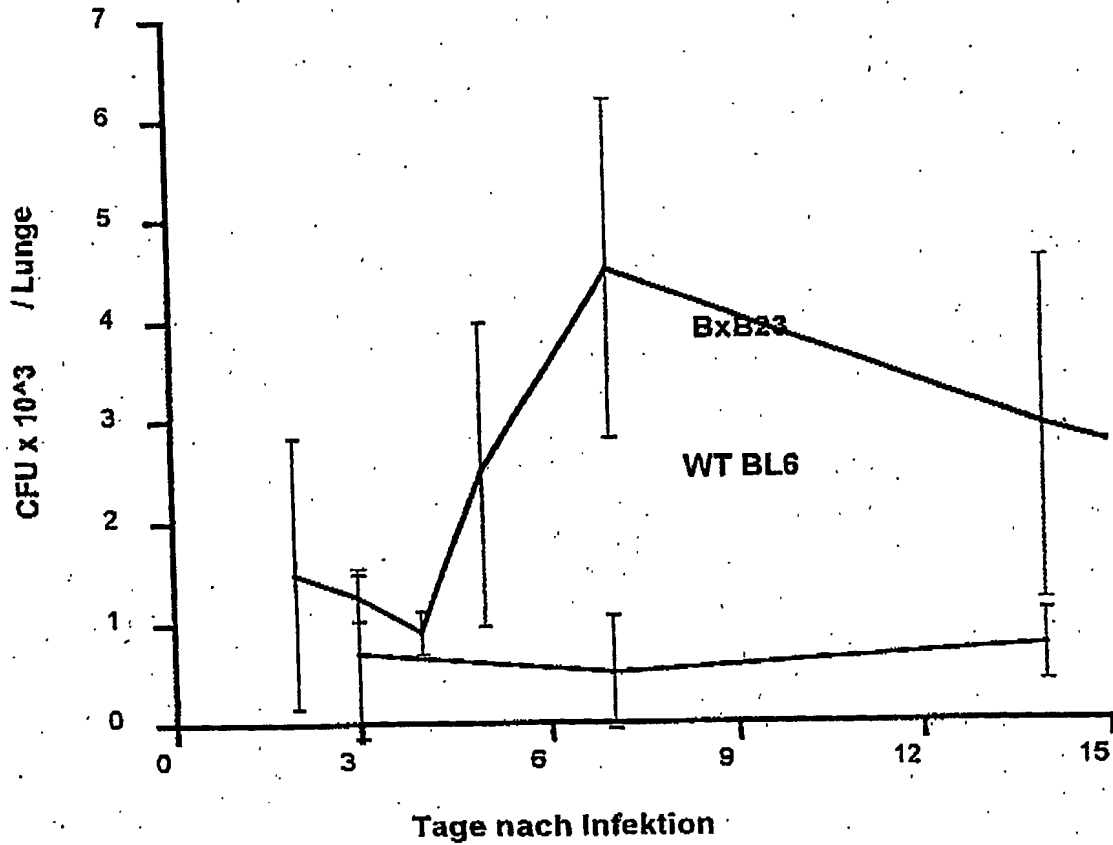
30

Fig. 1



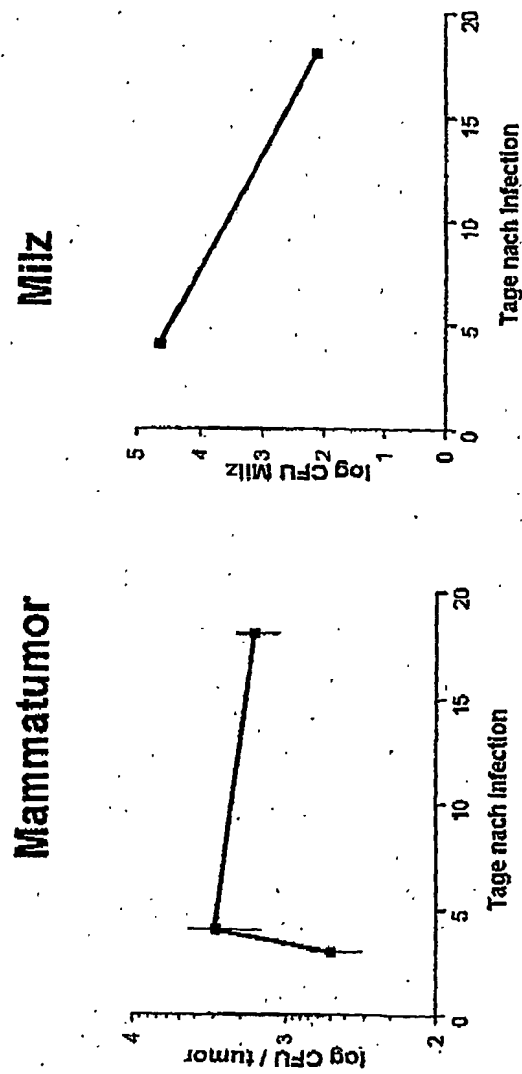
Bakterienzahl in Lungen oder Tumoren infizierter Mäuse 18 Stunden nach i.v. Injektion von infizierten Makrophagen oder freien Salmonellen.

Fig. 2



36

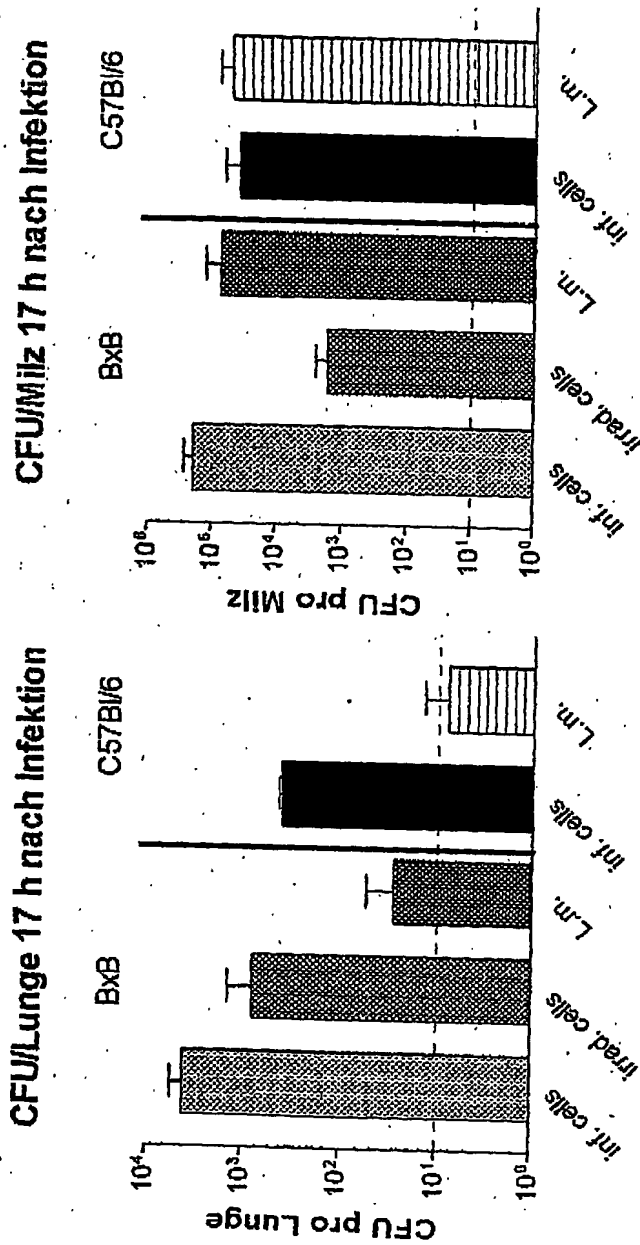
Fig. 3



Vergleich der CFUs in den Mammatumoren und in der Milz von MMTV/neo Mäusen  
nach i.v. Injektion von 5x10<sup>5</sup> S.typhimurium

35

Fig. 4



Bakterienzahl in Lunge oder Milz infizierter Mäuse 17 Stunden nach Infektion mit infizierten 4T1 Brusttumorzellen mit (irrad. Cells) oder ohne (inf. Cells) Bestrahlung mit 25 gray oder freien Listerien.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**